

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-83650

(P2000-83650A)

(43) 公開日 平成12年3月28日 (2000.3.28)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テマコード\* (参考)

C 1 2 M 1/34

C 1 2 M 1/34

E 2 G 0 5 8

G 0 1 N 35/10

G 0 1 N 35/06

J 4 B 0 2 9

K

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号

特願平10-257847

(22) 出願日

平成10年9月11日 (1998.9.11)

(71) 出願人 000204343

ファイザー製薬株式会社

東京都新宿区西新宿2丁目1番1号

(71) 出願人 596030209

エムエス機器株式会社

大阪府大阪市淀川区三国本町2丁目12番4号

(72) 発明者 田村 徹也

愛知県知多郡武豊町五号地2番地 ファイ  
ザー製薬株式会社中央研究所内

(74) 代理人 100077920

弁理士 折寄 武士

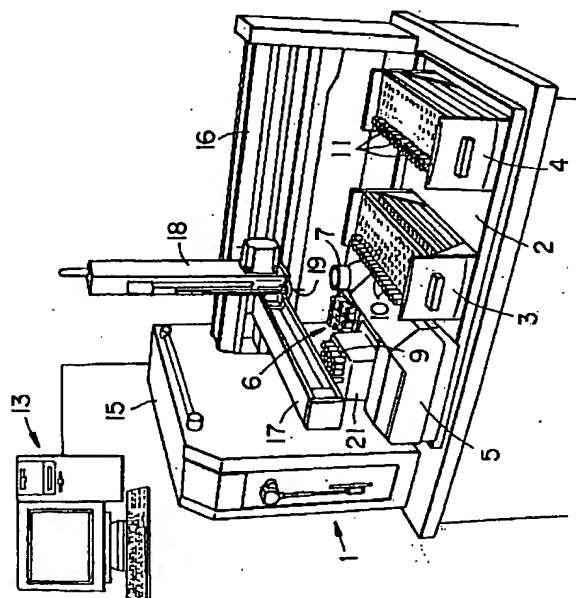
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酵素反応試験用の自動試験装置

(57) 【要約】

【課題】 酵素反応試験における、試薬の分注や反応時間の管理、反応サンプルの抽出などの作業を自動的に行って、反応条件や反応時間のばらつきを解消し、確度の高い試験を行えるようにする。併せて、ヒト由来組織の実験者への暴露を軽減する。

【解決手段】 分注用のプローブ19をX・Y・Zの各軸方向へ移動できる自動分注装置1と、制御装置13とからなる。処理テーブル2上に、バイアルラック3・4と、サーモミキサー5と、クーラーユニット6、および試料容器7を配置する。供試薬物溶液、共通試薬、分解酵素溶液などを、各機器のバイアル10・11・12に収容しておく。制御装置13に入力された試験パラメータに基づいて、分注、移注の手順を決定し、この手順に順って試薬などを分注し、反応サンプルを抽出する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 自動分注装置 1 と、この装置 1 の動作を制御する制御装置 13 とからなり、

自動分注装置 1 は、分注用のプローブ 19 を所定の位置に移動させるプローブ移送手段と、プローブ 19 に正圧または負圧を作用させて、試料などの吸引保持、および排出を制御する本体部 15 とを備えており、

自動分注装置 1 の近接位置に、一群のバイアル 10・11 を起立保持する少なくとも 1 つのバイアルラック 3・4 と、複数の反応バイアル 9 を所定の温度状態に保温しながら振盪攪拌するサーモミキサー 5 と、複数の試薬バイアル 12 を所定の温度状態に保冷するクーラーユニット 6 と、試料容器 7 とが定位配置されており、

予め制御装置 13 に入力された試験パラメータに基づき、所定の手順でプローブ 19 を移動操作しながら、各バイアル 9・10・11・12 と試料容器 7 との間で試料の分注、および移注を行うことを特徴とする酵素反応試験用の自動試験装置。

【請求項 2】 前記プローブ移送手段 X・Y・Z の各軸方向へ移動操作する X 軸腕 16、Y 軸腕 17、および Z 軸腕 18 からなり、複数のバイアルラック 3・4 と、サーモミキサー 5 と、クーラーユニット 6 と試料容器 7 が処理テーブル 2 上に配置されている、請求項 1 記載の酵素反応試験用の自動試験装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、薬物代謝試験に代表される酵素反応を自動的に行うための装置、詳しくは、供試薬物を所定の試験条件下で分解酵素と反応させ、所定時間が経過する毎に反応を停止させて、以後の分析に供される代謝反応サンプルの一群を自動的に生成するための装置に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 この種の代謝試験は、新薬の開発過程で頻繁に行われており、試験操作の殆どの部分は、手作業によって行われている。個々のサンプルの試験手順は、全て共通している。従って、作業者は試薬や分解酵素液などの分注操作、および、反応済みサンプルの移注操作などを繰り返し行うだけである。しかし、殆どの場合には、複数種の供試薬物毎に複数個ずつ、時間をずらしながら同時に試験するので、各サンプル毎に時間を管理しながら、分注などの作業を行わねばならない。

【0003】 本発明の試験装置においては、試薬や供試薬物の分注操作などを、X・Y・Z の各軸方向へ往復動する腕を備えた自動分注装置で行うが、この装置自体は市販されていて公知である（ギルソン社、リキッドハンドラー、型番 215）。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】 上記のように、従来は多くの人手を掛けて酵素反応試験を行っている。そのた

め、1 回の試験に多くの時間を要する。研究者あるいは研究者と同等の技術を有する熟練した作業者が不可欠となるため、人的コストが高くつくうえ、単位時日当たりの処理量に限界がある。手作業である以上、試薬の分注量のばらつきや、反応停止までの時間のばらつき、あるいは個々の作業者の癖などを避けられないので、試験結果にばらつきを生じやすい。人為的な操作ミスを生じる余地もあり、こうした場合には、試験そのものを始めからやり直さねばならないこともある。試薬の分注などを行う場合に、作業者が人に由来する生体組織に暴露されるおそれもある。

【0005】 本発明の目的は、酵素反応試験を自動的に行えるようにして、酵素反応試験に要するコストおよび時間を削減し、新薬開発などのコストを減少することにある。本発明の他の目的は、試薬の分注や時間管理などの作業を自動化することにより、反応条件や反応時間のばらつきを解消し、常に一定の試験結果が得られ、従って確度の高い酵素反応試験を行える自動試験装置を提供することにある。本発明の他の目的は、必要に応じて無人状態で酵素反応試験を行うことができ、従って酵素反応試験を能率良く行えるうえ、接触や暴露が問題になる分解酵素を用いて試験を行うような場合でも、安全にしかも確実に酵素反応試験を行える自動試験装置を提供することにある。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明の自動試験装置は、自動分注装置 1 と、自動分注装置 1 の動作を制御する制御装置 13 とからなる。自動分注装置 1 は、分注用のプローブ 19 を所定の位置に移動させるプローブ移送手段と、プローブ 19 に正圧または負圧を作用させて、試料などの吸引保持、および排出を制御する本体部 15 とを備えている。自動分注装置 1 の近接位置に、一群のバイアル 10・11 を起立保持する少なくとも 1 つのバイアルラック 3・4 と、複数の反応バイアル 9 を所定の温度状態に保温しながら振盪攪拌するサーモミキサー 5 と、複数の試薬バイアル 12 を所定の温度状態に保冷するクーラーユニット 6 と、試料容器 7 とを定位配置する。予め制御装置 13 に入力された試験パラメータに基づき、所定の手順でプローブ 19 を移動操作しながら、各バイアル 9・10・11・12 と試料容器 7 との間で試料の分注、および移注を行う。

【0007】 具体的には、前記プローブ移送手段 X・Y・Z の各軸方向へ移動操作する X 軸腕 16、Y 軸腕 17、および Z 軸腕 18 からなり、複数のバイアルラック 3・4 と、サーモミキサー 5 と、クーラーユニット 6 と試料容器 7 が処理テーブル 2 上に配置されている。

## 【0008】

【作用】 酵素反応試験は、必要な試薬溶液や分解酵素溶液が収容された試薬バイアル 12 をクーラーユニット 6 上の所定位置に配置し、反応バイアル 9 や他のバイアル

10・11を、サーモミキサー5および各バイアルラック3・4に装填し、試料容器7に必要な量の試料を貯留することから始まる。この準備作業は人手で行う。次に、自動分注装置1を作動させて、試料を各バイアル9・10・11・12に分注し、前段処理を完了する。この状態で分解酵素溶液を反応バイアル9に添加して、サーモミキサー5を作動させ、反応バイアル9内の反応サンプルを混合し、一定時間だけ前段反応（温度平衡化）を行う。この後、スタート試薬を添加して代謝反応を開始する。一定時間が経過した時点で、反応バイアル9内の反応サンプルの一部を取り出して、反応停止試薬が予め分注してあるバイアル11に移注する。以後は、一定時間が経過することにより、反応液の移注を繰り返し行うことにより、各経過時間毎に代謝反応サンプル群を生成できる。

【0009】分注や移注などの手順は、制御装置13に試験パラメータを入力した時点で予め決定されており、各反応バイアル9の時間管理や、分注動作どうしの相互干渉を避けるための手順設定などは、制御装置13に組み込まれたプログラムによって制御される。

【0010】

【発明の効果】以上のように本発明の自動試験装置によれば、人手を要するのは当初の準備作業のみに限られ、一連の代謝反応試験を自動的に行える。自動分注装置1を利用して機械的分注、移注を行い、しかもそのタイミングを制御装置13で精密に規定するので、試験条件や反応時間のばらつきがなく、しかも誤操作を生じる余地がないので、その分だけ酵素反応試験の確度を向上して、試験結果の信頼性を高めることができる。準備作業が終わった後には、一連の代謝反応試験を、人手を煩わす必要もなく自動的に行えるので、一連の試験を能率良く行って、試験に要するコストを著しく削減できるうえ、接触や曝露が問題となる分解酵素を扱う場合であっても酵素反応試験を安全に行うことができる。

【0011】

【実施例】図1～図3に、本発明に係る自動試験装置の実施例を示している。図1において自動試験装置は、自動分注装置1と、その処理テーブル2上にそれぞれ定位配置した、複数のバイアルラック3・4、サーモミキサー5、クーラーユニット6、試料容器7などの機器と、これらの機器3～7で起立保持される4群のバイアル9・10・11・12、および自動分注装置1の動作を制御する制御装置13などで構成してある。

【0012】自動分注装置1は、処理テーブル2の一侧端に隣接して配置した本体部15と、処理テーブル2の後縁に沿って本体部15から突設されるX軸腕16と、X軸腕16で左右に往復操作されるY軸腕17と、Y軸腕17で前後に往復操作されるZ軸腕18とを有し、Y軸腕17に対して上下に往復動するZ軸腕18の前面下端に、中空針状の分注用のプローブ19を配置してな

る。本体部15の内部には、プローブ19の先端から試料などを正確に吸引または吐出し、プローブ19の内部を洗浄し、あるいは蒸留水を供給するためのシリンジポンプと3方バルブなどが配置されており、これらの機器の動作を制御することにより、プローブ19で試料などを吸引保持し、あるいは保持していた試料などを排出できるようにになっている。なお、プローブ19と本体部15とは、フレキシブルなチューブを介して接続してあるが、図1においては図示していない。上記の各腕16・17・18を連繋して作動させることにより、プローブ19を処理テーブル2上の任意位置へ移動でき、各バイアル9～12と試料容器7との間で分注や移注を行える。

【0013】2個のバイアルラック3・4のうち、サーモミキサー5に隣接する側のバイアルラック3には、化合物溶液、つまり供試薬物の溶液を収容したバイアル10の一群が装填してある。処理テーブル2の右方に位置するバイアルラック4には、一定時間が経過することにより反応バイアル9から移注される、代謝反応サンプルを受け入れるためのバイアル11の一群が装填してある。このバイアル群は、供試薬物の種類数に、異なる反応時間毎に反応バイアル9から取り出される代謝反応サンプルの数を掛け合わせた数が用意され、その内部には分解酵素の反応を停止させるための停止試薬（アセトニトリル）が予め分注してある。例えば、3種の供試薬物について、代謝反応の開始時点から0分、5分、30分、60分、120分ごとに反応サンプルを2個ずつ取り出す場合には、30本のバイアル11を用意しておく。

【0014】サーモミキサー5は市販品であって、本体上部の反応ラック21に複数の反応バイアル9が装填される。反応バイアル9の上端はゴムキャップ9aで塞がれているが、プローブ19はゴムキャップ9aを突き抜いて、反応バイアル9内に試料などを分注でき、あるいは反応バイアル9内の代謝反応サンプルを取り出すことができる。反応バイアル9は反応ラック21内のヒーターによって所定の温度状態に保温され、反応ラック21が一定の軌跡で円運動することによって、反応バイアル9内の反応サンプルを振盪攪拌できる。

【0015】先に説明したように、プローブ19は各反応バイアル9に対して試料および反応サンプルなどの出し入れを行うが、その間だけ反応ラック21の駆動を停止させる。しかし、反応ラック21が停止するときの位置は必ずしも一定ではないので、特定の反応バイアル9に対して試料および反応サンプルなどを出し入れするのが困難になる。こうした事態に対処するために、反応ラック21を反応バイアル9の開口直径より僅かに小さな直径値の円軌跡に沿って駆動して、反応ラック21が停止したときの反応バイアル9の中心のずれ量が、基準値に対して先の開口の半径値よりも小さくなるようにしている。つまり、プローブ19を基準位置において下降操

作するだけで、その位置に配置された反応バイアル9に対して、試料などの出し入れを確実にできるようにしてある。

【0016】クーラーユニット6は、蓄冷材を内蔵する容器本体6aと、試薬バイアル12を起立保持する蓋体6bとからなり、試薬バイアル12に收容された試薬および分解酵素溶液などを低温の状態に保冷する。各試薬バイアル12には、リン酸緩衝液、グルコース6リン酸溶液、グルコース6リン酸脱水酵素、反応開始試薬などの共通試薬と、分解酵素溶液がそれぞれ收容される。試料容器7には停止試薬を收容する。

【0017】制御装置13は、汎用のコンピュータシステムで構成されており、自動分注装置1の動作手順を時間の経過に従って制御するプログラムが組み込まれている。試験を行う前に、供試薬物の種類とその收容位置、サンプリングすべき時間、各試料などの收容位置および分注量などの試験パラメータを例えばキーボードで入力することにより、代謝反応試験の手順が決定され、記憶される。このパラメータ入力に併行して、各試料群および分解酵素などを收容するバイアルを、所定位置に配置しておく。

【0018】

【試験例】上記の自動試験装置を用いて、チトクロムP450の代表的基質のひとつであるワーファリン(Warfarin)の代謝反応試験を行った。使用するミクロソームとしては、ラットの肝ミクロソームの溶液(濃度0.5 mg/ml)を用いた。試験は、各試料などを分注する前段処理と、一定時間が経過する毎に反応サンプルを反応バイアル9から取り出して、代謝反応を停止させる反応処理とに大別される。

【0019】(前段処理)先に説明したように、準備作業と試験パラメータの入力が終わったら、自動分注装置1を作動させて、以下の手順で試料などの分注を行う。なお、試料などの濃度は次のように調整してある。

リン酸緩衝液……………1 mol / l  
グルコース6リン酸……………40 mmol / l  
グルコース6リン酸脱水酵素…1000 units/ml  
供試薬物溶液……………12 μmol / l  
反応開始試薬……………還元型ニコチン酸アミド  
アデニンジヌクレオチド(5.5 mol / l)の溶液と、ニコチン酸アミドアデニンジヌクレオチドホスフェート(8 mol / l)の溶液の混合液。

【0020】■ 反応停止試薬(アセトニトリル)を試料容器7から980 μlずつ取り出して、右方のバイアルラック4に装填した各バイアル11に分注する。

■ クーラーユニット6上のバイアル12から、リン酸緩衝液を120 μlずつ取り出して、各反応バイアル9に分注する。さらに490 μlの蒸留水を各バイアル9に注入する。

■ クーラーユニット6上の別のバイアル12から、グ

ルコース6リン酸溶液を100 μlずつ取り出して、各反応バイアル9に分注する。

■ クーラーユニット6上のさらに別のバイアル12から、グルコース6リン酸脱水酵素溶液を10 μlずつ取り出して、各反応バイアル9に分注する。

■ 左方のバイアルラック3に装填したバイアル10から、供試薬物溶液を100 μlずつ取り出して、各反応バイアル9に分注する。以上で前段処理を終了する。なお、プローブ19は必要に応じて水洗浄される。

【0021】(反応処理)

■ クーラーユニット6上の試薬バイアル12から、ミクロソーム(分解酵素溶液)を120 μlずつ取り出して、各反応バイアル9に分注する。この後、サーモミキサー5を起動して攪拌を開始する。反応バイアル9は反応ラック21内のヒーターで37℃に保温し続ける。

【0022】■ クーラーユニット6上の試薬バイアル12から反応開始試薬溶液を200 μlずつ取り出し、上記■の分注終了時点から5分が経過した反応バイアル9毎に分注する。各反応バイアル9においては、反応開始試薬溶液を分注した後、プローブ19をキャップ9aから抜き外した状態で数秒間攪拌し、再びプローブ19を反応バイアル9に突き刺して、200 μlの反応サンプルを吸引し、右方のバイアルラック4上の2個のバイアル11に100 μlずつ分注する。これが試験開始後0分の反応サンプルであって、供試薬物の種類数の2倍の数の反応サンプルがバイアルラック4上に得られる。なお、プローブ19は、各反応バイアル9毎に水洗浄される。

【0023】■ 反応開始試薬溶液の添加(上記■)から10分経過した時点で、上記と同様にして各反応バイアル9から200 μlの反応サンプルを吸引し、右方のバイアルラック4上の2個のバイアル11に100 μlずつ分注する。各バイアル11には予め反応停止試薬が分注してあるので、反応サンプルの酵素分解作用は停止される。各反応バイアル9毎に同様のサンプリングを行う。

■ 反応開始試薬溶液の添加から30分、60分、120分が経過する毎に、上記■と同様のサンプリングを行って、酵素反応試験を終了する。

【0024】以後は、得られた反応サンプルに含まれる供試薬物の残存量を、高速液体クロマトグラフィーと質量分析装置を用いて測定することにより、供試薬物の分解酵素による代謝の度合や速度などを知ることができる。なお、■～■の前段処理の分注の手順は、必ずしも記載順である必要はなく、バイアル配列や反応バイアルとの位置関係で変更することができる。分注する試薬の容量や反応サンプルの採取回数、あるいは反応時間などの試験パラメータは、試験の目的や条件の違いに応じて任意に変更できる。

【0025】本発明者らは、自動試験装置の信頼性を評

価するために、熟練研究者が手作業のみで試験を行い、これと同一内容の試験を自動試験装置で行った場合について、試験結果を比較した。その結果、本発明装置による試験結果は反応サンプル毎の代謝傾向にばらつきがなく、確度の高い試験が行えるのを確認している。

【0026】上記の実施例では、X軸腕16が本体部15から直交状に突き出ている自動分注装置1を例示したが、その必要はない。例えば、本体部15の内部にX軸腕16が収容してあってもよい。処理テーブル2上における各機器3・4・5・6・7のレイアウトは任意に変更できる。また、バイアルラック3・4の設置数は、必要に応じて増加でき、両ラック3・4に装填されるバイアル10・11の隣接境界は、各ラック毎である必要はない。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】自動試験装置の斜視図である。

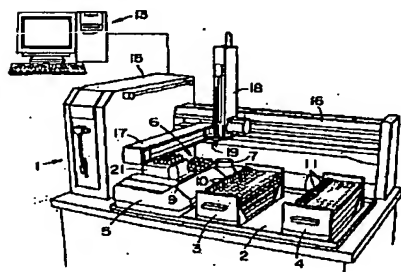
【図2】サーモミキサーの斜視図である。

【図3】処理テーブル上の機器配置を示す平面図である。

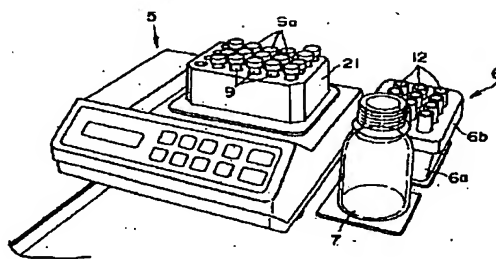
#### 【符号の説明】

- 1 自動分注装置
- 2 処理テーブル
- 3 バイアルラック (左)
- 05 4 バイアルラック (右)
- 5 サーモミキサー
- 6 クーラーユニット
- 7 試料容器
- 9 反応バイアル
- 10 バイアル
- 11 バイアル
- 12 試薬バイアル
- 13 制御装置
- 15 本体部
- 15 16 X軸腕
- 17 Y軸腕
- 18 Z軸腕
- 19 プローブ

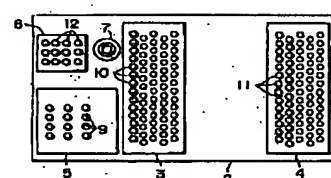
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

Fターム(参考) 2G058 AA09 BB02 BB07 BB09 BB12  
CC08 EA02 EA04 EA08 ED02  
FA03 FA07 GE06  
4B029 AA07 AA27 BB16 BB20

40